

Bevezetés

Bár a tápcsatornát folyamatosan és jelentős mennyiségben terhelik idegen antigének, mégis a tápcsatornához kapcsolt immunválasz jellemzője a tolerancia. A szervezet szelektíven eltűri a táplálékkal nagy mennyiségben bejutó fehérje antigéneket vagy a tápcsatornában kolonizálódott mikrobákat, ugyanakkor a kóros sejtekre, allergénekre, patogén mikrobákra, vírusokra gyulladással kísért túlérzékenységi reakcióval, esetleg válaszképtelenséggel reagál. Immun-exklúziós védőválasz során a patogén mikrobák kolonizációját és a makromolekulák penetrációját gátló szekrécións ellenanyagok termelődnek, míg a helyi és perifériális túlérzékenységi reakció elnyomására toleranciát eredményező immun-regulációs mechanizmus indul. Az immunrendszer éretlen volta vagy kóros működése viszont, ételfertőzéshez, allergiához, autoimmun betegségek, esetleg rák kialakulásához vezethet. A reakció mechanizmus megismerése még tudományos viták kereszttüzében áll.

Az orális vakcinákkal és a toleranciával kapcsolatos kutatások megnövelték a tápcsatorna immunitás iránti érdeklődést. Megfigyelték, hogy az orálisan bejuttatott, T-sejt függő marker antigének (pl. óvalbumin) immunológiai felismerése az antigént prezentáló (AP) sejtek, a T sejtek, majd az IgA elkötelezett B sejtek aktivációjával jár a Peyer-plaque-okban. Az elkötelezett immunsejtek visszavándorolnak a bejutás helyétől távoli, tápcsatorna és más területek védelmét ellátó nyálkahártyába, mint pl. a lamina propiába. Itt, egy újabb antigén ingerre az elkötelezett IgA⁺ B sejtek citokin (TGF- β) vezérelt érését követően IgA típusú ellenanyagot választanak ki a bélbe. Az immunregulációért felelős, aktivált Th3 sejtek által kiválasztott citokinek (TGF- β , IL-10) pedig toleranciát (immun-szuppressziót) indítanak a periférián (Mayer et al., 2001) Gyulladásos reakció esetén az antigén prezentációt követően Th1/Th2 sejt függő, aktív immunválasz indul, illetve memória sejtek termelődnek (Kjerrulf et al., 1998).

Ugyanaz az antigén lehet tolerogén és immunogén is, attól függően, hogy milyen az antigén szerkezete és mérete, az adagolt dózis és hol történik az antigénfelvétel (Garside et al., 1999). Azt, hogy egy antigén milyen választ indít a periférián, alapvetően függ attól, hogy az AP sejtektől érkezik-e egy ko-stimulációs szignál a T-sejtek felé. Az oldható, monomer antigének, együtt adott adjuváns hiányában, ismételt antigén adásra immunológiai válaszképtelenséget eredményeznek. Ezzel szemben, egy partikulált antigén vagy egy adjuvánssal együtt adott oldható antigén, ismételt antigén terhelésre produktív immunválaszt eredményez. Ennek vélhető oka az inflamációs citokinek indukciója és az AP sejtek ko-stimulációs receptorainak aktivációja. (Brandtzaeg, 2001) Az éretlen vagy kórosan működő AP vagy Th3 sejtek antigén ingerre képtelenek a B sejtek aktivációját elindítani, mely a korai elválasztásnál súlyos fertőzést eredményezhet (Strobel & Mowat, 1998).

Kutatások igazolták, hogy az orális adjuvánsok (pl. mitogének, szuperantigének, mint pl. maga a bélflóra vagy az inaktivált bakteriális sejtfal antigének) segítik a T-sejt függő antigénnel vagy hapténnel szembeni nyálkahártyához kapcsolt védőválasz kialakulását (Garcia & Weiner, 1999). Ismert tény, hogy a *Cholera* toxin (CT) vagy az *Escherichia coli* hőstabil enterotoxin (LT), illetve ezek nem toxikus lektin B-alegysége adjuvánsként kiválóan alkalmazható a szisztémás és a nyálkahártyához kapcsolt immunválasz manipulálásában. Ez utóbbit kihasználva, erőteljes kutatás indult az adjuvánssal együtt adott vakcina antigénekre, tolerogén peptidekre kiváltható specifikus IgA szekrécións válasz stimulálására. (Rappuoli et al, 1999).

A növényi agglutininekkal (ConA, SBA, PHA) folytatott kutatások rámutattak arra, hogy a növényi lektinek is képesek a tápcsatorna immun-kizáró védelmét erősíteni. Bizonyítást nyert, hogy az orálisan bejuttatott fagyöngy (misletoe type-RIP) lektin T-sejt proliferációt stimuláló citokinek termelését indukálta. (Gelencsér et al., 2000).

Szintén ez a felismerés vezetett el a mikrobiális probiotikumok (élő mikrobákat tartalmazó élelmiszer/takarmány kiegészítők) alkalmazásához. A kutatások középpontjában élő tejsav- vagy bifidobaktérium kultúrával erjesztett tejfehérje adása állt. Megfigyelték, hogy alkalmazást követően javult a tápcsatorna mikrobiális egyensúlya. A probiotikumok ugyanis gátolják a patogén baktériumok kitapadását és kolonizációját, segítik a nem specifikus immunvédelmet. A táppal bevitt élő tejsavkultúrák csökkentik a pH-t, a redox potenciált, mikroba gátló anyagokat (szerves savak, hidrogénperoxid, bakteriocinek) termelnek, mellyel gátolják a patogének túlélésének esélyét. Laktáz, illetve galaktozidáz aktív törzsek laktáz enzim hiányos egyedben csökkentik a laktóz intolerancia veszélyét. A koleszterint asszimiláló törzsek csökkenthetik a koleszterin akumlációt a szervezetben. A törzsek proteolitikus aktivitása révén a tápfehérje antigenitása csökken, könnyen felszívódik. (Sanders, 1993) Napjainkban a tejipar a tápcsatorna egészséges működését fenntartó ún. természet azonos tejsav baktériumokat (lactic acid bacteria, LAB) forgalmaz. Más Gram-pozitív baktériumokat (*Streptococcus thermophilus*, *S. faecalis*) haszonállatok számára forgalmaznak. Bár hivatalosan nem tartják probiotikus baktériumnak a sajt és szalámi fermentációban alkalmazott starterkultúrákat (*S. thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*), mégis táplálékunk szerves részét képezik. A *Bifidobacterium* fajok és a LB törzsek a vastagbelet betelepítő normál flóra részét képezik, melyek a patogén mikrobák kitapadásának gátlásán túl bakteriocinek is termelnek (Matsuzaki & Chin, 2001). Nem hagyható azonban figyelmen kívül, amin-szintetizáló tulajdonságuk sem, amelynek eredményeként a fermentált élelmiszerek hisztamin-, tiramin illetve biogén amin-koncentrációja jelentősen meghaladja az ajánlott értéket (Baráth et al, 1999).

A probiotikumként adott baktériumok ugyanakkor képesek az immunválasz modulálására is. *Lactobacillus casei* törzs Shirota (LcS) etetése a velünk született immunitásban, rákos megbetegedésekben aktív szerepet játszó természetes ölüsejtek (NK-sejtek) aktivitását fokozta. Elölt LcS etetése Th1-es utat indító citokinek termelését stimulálta egerben. Ez utóbbi, az óvalbuminnal érzékenyített állatok specifikus IgE ellenanyagszintjét csökkentve az allergiát indító mechanizmusút gátlásához vezetett. Probiotikus baktériumok etetése, mint *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactobacillus fermentum* (Lf) és az élesztő (Y) különböző típusú immunválasz kiváltására volt képes. Lf/Y-vel előzetetett és óvalbuminnal érzékenyített állatott vakcina antigénre (óvalbumin) adott ellenanyag és sejtes immunválasza javult. Ugyanakkor az előkezelt állatok immunválasza ismételt probiotikum adására szupresszió alá került. Így, a probiotikummal együtt adott antigénre adott immunválasz tehát modulálható az aktív (vakcinálás) és a szupressziós válasz (autoimmunitás, allergia elnyomása) irányába (Matsuzaki & Chin, 2001; Capurso, 2001; Kirjavainen, 2005).

Célkitűzés

Kutatási munkánk során, patkány-modell segítségével kívántuk demonstrálni, hogy a növényi és mikrobiológiai eredetű sejtalkotók (lektinek, szelektált élő tejsavbaktérium és fagyasztással, hővel, besugárással elpusztított holt sejtek, valamint ezekből és élesztőből tisztított sejtfalalkotók és DNS) orális adjuvánsként történő alkalmazása lehetővé teszi a tápcsatorna immunitás modulálását, melyet egy T-sejt függő marker antigénre (óvalbumin) adott sejtes és humorális immunválasz vizsgálatával jellemeztünk.

Eredmények ismertetése

LAB törzsek szelekciója

A tápcsatornában rezisztens, jó fermentációs és mikroba gátló tulajdonsággal rendelkező LAB törzseket szelektáltunk. A szelekciónál természetesen megjelenő szempont volt még a fermentáció során esetlegesen képződő biogén aminokat (pl. hisztamin), illetve keserű peptideket termelő törzsek kizárása (A. Halász, 2002).

A fenti szempontokat figyelembe véve a Perugia Egyetem törzstenyészetéből előszelektált, autentikus LAB törzsek növekedését vizsgáltuk a tápközeg összetétel hatására. A számottevő növekedést produkáló tápközeg (MRS, pepton víz + élesztőkivonat, pepton víz + élesztőkivonat + glükóz) közül az MRS eredményezte a legjobb szaporodást és már 27 órás inkubációs idő után már kedvező növekedést biztosított (1. táblázat).

1. táblázat: A vizsgált LAB törzsek növekedése MRS tápoldatban

Törzs/Inkubációs idő	19 óra	27 óra	43 óra	67 óra
<i>Lb. Plantarium</i> 2142	0,512	1,873	2,287	2,215
<i>Lb. Casei subsp. casei</i> 2752	0.598	2,045	2,369	2,331
<i>Lb. Curvatus</i> 2770	0,513	2,006	2,334	2,304

A fermentációs aktivitást a tejsavtermeléssel, a relatív pH-csökkenési sebességgel jellemeztük. A tejsav-szintézisben figyelmet fordítottunk a D/L-tejsav arányra is élettani szempontok alapján. A tejsavtermelést Bóringier Mannheim enzim teszttel vizsgáltuk.

A mikrobagátlásra történő szelekciónál a bakteriocin képzésre vizsgált LAB törzsek közül, elsősorban azokat tartottuk érdekesnek, amelyek több teszt baktérium ellen is gátló hatást mutattak (Halász et al., 2004).

A tesztorganizmusokkal szembeni gátló hatást különböző összetételű tápközegben inkubált LAB törzsek 24 órás tenyészetének szűrletéből (nyers bakteriocin oldat) vizsgáltuk agar-diffúziós teszttel. A bakteriocin titer meghatározást tova futó hígítási sorral mikrotiter lemezen történő vizsgálattal végeztük.

A bakteriocin hatást *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus* penésztörzsekre, valamint *Candida galbrata* CBS 138 és *Saccharomyces cerevisiae* 2880 élesztő törzsekre ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy a gátló hatás az erősen függ a termelő törzstől. Élesztő gátolhatóságát vizsgálva, a tápközeg összetétel befolyása itt is megjelent (Zalán & Baráth, 2003).

Az LAB törzsek által termelt H_2O_2 antimikrobiális szempontból előnyös, de nagyobb koncentrációban a termelő sejtet, valamint a humán bélsejteket is károsíthatja. A tejsavbaktériumok H_2O_2 termelését MRS táptalajon vizsgálva, 24 órás sejtekkel határoztuk meg, melyet a táplétól centrifugálással elkülönítve, foszfát pufferes mosást követően különböző inkubálási periódusban határoztunk meg (Zalán et al., 2005). A H_2O_2 képződés törzs és szubsztrátfüggő volt. A legnagyobb H_2O_2 koncentrációt az *L. plantarum* 2142 képezte, a törzs által 24-48 óra alatt termelt H_2O_2 *L. monocytogenes* és *B. cereus* tesz organizmusokra gátló hatást fejtett ki, míg *E. coli*-val szemben nem.

A szelekcionál fontos szempontként tartottuk szem előtt az összbiogénamin termelést, mivel egészségügyi szempontból kedvezőtlen a nagy összamin és ezen belül is a hisztamin és tiramin kiválasztás. A vizsgált autentikus 28 LAB egyike sem termelt hisztamint, de egy kivételével, mindegyik szintetizált tiramint, noha eltérő mértékben.

A hisztamint nem képző és 10 mg/l alatti összamin termelők közül több olyan LAB törzset is találtunk, amely legalább 3 romlást okozó illetve patogén baktérium ellen mutatott gátló hatást és ezek közül néhánynak élesztő illetve penészgátló aktivitását is igazoltuk. A biogén amin képződést MRS tápoldatra a szaporított LAB törzsek felülúszójából oszlopkromatográfiásan határoztuk meg (Halász, 2002). A mért koncentráció értékek jó összefüggést mutattak a szubsztát koncentráció, hőmérséklet és pH összefüggésében bekövetkező az aminosav dekarboxiláz és diaminoxidáz enzimek aktivitásának változásával, melyet elsődlegesen a hozzáférhető szubsztrátum (aminosav), és a mikroorganizmus aminosav dekarboxiláz, valamint aminosav oxidáz aktivitása befolyásolt. A hisztidin dekarboxiláz negatív törzsek nem termeltek detektálható mennyiségben hisztamint (2. táblázat).

2. táblázat: Az előszelektált LAB törzsek biogén amin képzése MRS tápoldatban (μg amin/ml felülúszó)

	PUT	HIST	CAD	SPED	AGM	SPER	TYRM
<i>Lb. Plantarium</i> 2142	*	**	*	0,45	**	0,38	0,54
<i>Lb. Casei subsp. casei</i> 2752	*	**	*	0,26	**	0,20	0,98
<i>Lb. Curvatus</i> 2770	0,70	**	*	0,33	0,38	0,67	6,20

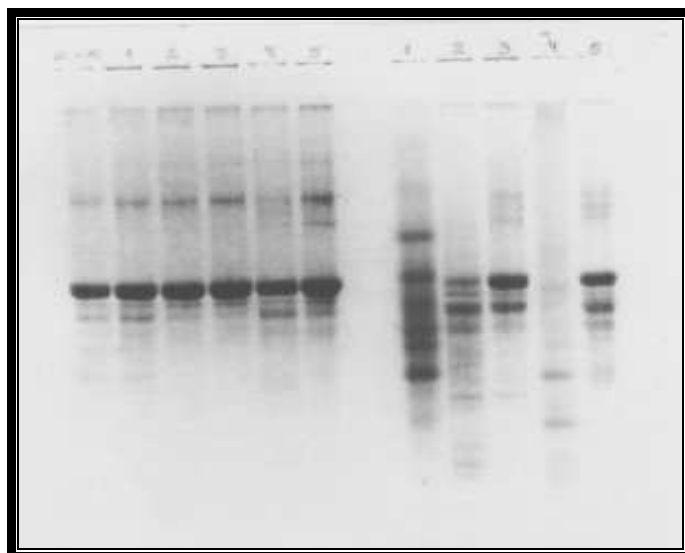
* nyomokban

** nem kimutatható

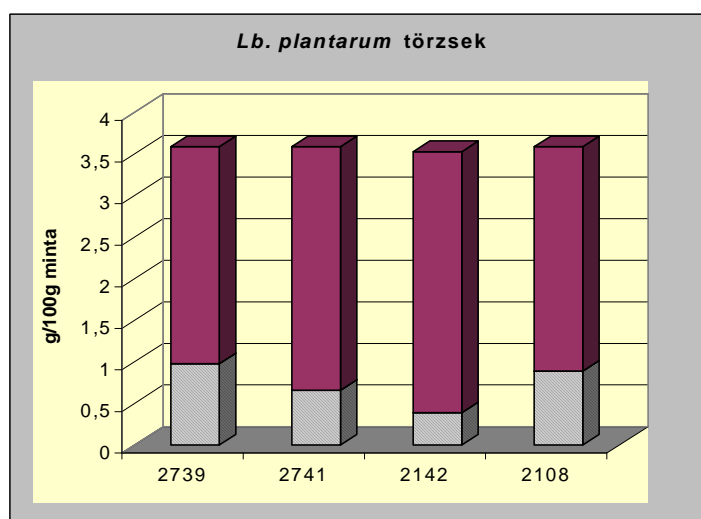
PUT- putresszin, HIST - histamin, CAD - kadaverin, SPED – spermidin, AGM – agmatin, SPER – spermin, TYRM - tiramin

Az MRS táptalaj már 0,1 % hisztidinnel történő kiegészítése is a hisztamin képzést növelte. Az a körülmény, hogy az aminosav összetétel meghatározó volt a hisztamin képzés szempontjából arra mutat, hogy a peptid kötésben lévő aminosav esetében a proteáz aktivitás a meghatározó az amin képződés szempontjából. A LAB törzsek proteolitikus aktivitását pasztörözött tej beoltásával végeztük. A proteináz aktivitással (1. ábra) való korrelációt mutatott az egyes törzsek össz amin képzése és kazeináz aktivitása is. A hidrolizátumok tejfehérje allergiás betegszérumokkal szembeni IgG reaktivitása mérhető csökkenést mutatott (2. ábra), mely a proteolitikus enzimaktivitással jó korrelációban volt (Baráth et al., 2004).

A tejsavbaktériumok a bélhámfalhoz tapadva fontos szerepet játszanak a bélcsatorna védelmi funkciójának kialakításában. A heterofermentatív törzsek metabolizmusuk során szerves savakat, bakteriocineket és hidrogén-peroxidot (H_2O_2) termelnek. Ezek az antimikrobiális tulajdonságú komponensek visszaszorítják, vagy megakadályozzák a kórokozó ill. patogén mikroorganizmusok növekedést. Ezért az előszelektált LB törzsekből a tápcsatornában jól kitapadó és kolonizálódó, bélnedvekkel és epesavakkal szemben ellenálló, megfelelő enzim aktivitású LB törzseket szelektálunk (Németh et al., 2006).



1. ábra: Szelektált LAB törzsekkel bontott alfa-kazein peptidek Urea-PAGE elválasztási képe (1 - *Lb. curvatus*, 2 - *Lb. acidiphilus*, 3 - *Lb. casei-casei*, 4 - *Lb. plantarium*, 5 - *Lb. casei* – *spseudoplatarum*)

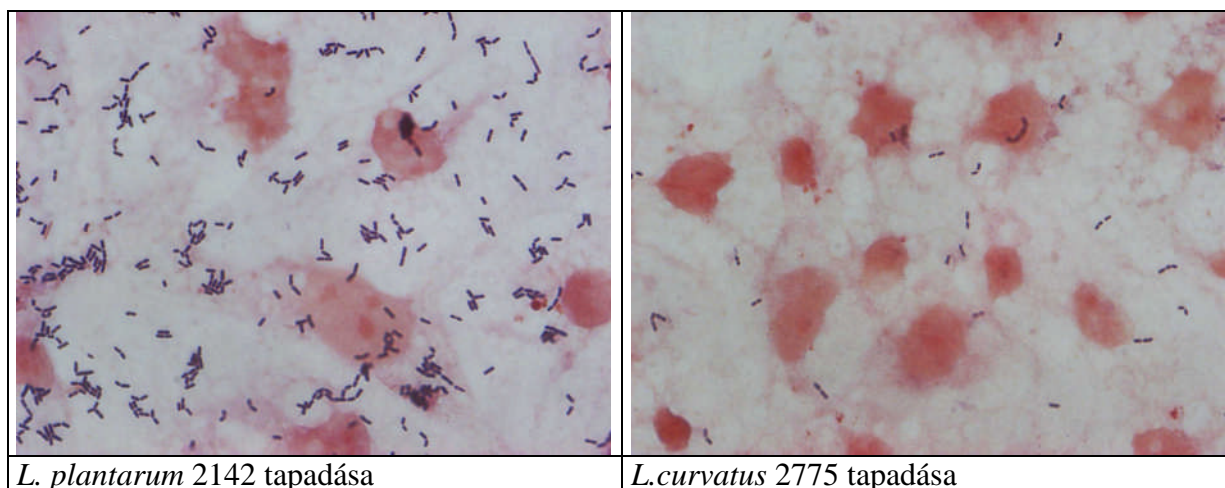


2. ábra: *Lb. Plantarium* törzsszel bontott tejfehérjéből keletkező immunreaktív peptidek részaránya a referencia (tej) fehérjében (■ - tejfehérje, ▨ - immunreaktív peptidek)

A tejsavbaktériumok tapadását humán vastagbél adenocarcinoma Caco-2 sejteken vizsgáltuk (Németh et al., 2003; Németh et al., 2004a; Németh et al., 2004b), ami mind funkcionális, mind strukturális tulajdonságaiban hasonlóságot mutat a normál vékonybél epiteliális sejtekhez.

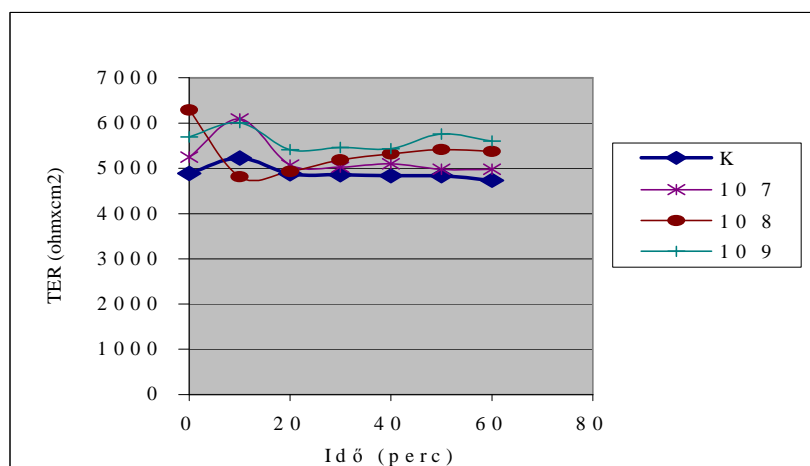
A kitapadás vizsgálat során 24 órás *L. plantarium* 2142 és *L. curvatus* 2775 tejsavbaktérium tenyészeteket ($\sim 10^9$ CFU/ml) 10x-ra hígítottunk ($\sim 10^8$ CFU/ml) és a differenciálódott Caco-2 sejteket 1 órán át inkubáltuk tejsavbaktériumokkal, majd mosást és fixálást követően Gram festéssel vizsgáltuk a tapadó baktériumokat (3. ábra).

Mivel *L. plantarium* 2142 jobb kitapadást mutatott következő vizsgálatainkat ezzel a törzsszel folytattuk. Különböző koncentrációjú *L. plantarium* 2142-vel inkubáltuk a polikarbonát membránon tenyésztett Caco-2 sejteket és a transzepiteliális elektromos rezisztencia (TER) változását követtük nyomon, ami a bélhámsejtek membránjának áteresztettségére adott információt, továbbá DAPI festéssel néztük a Caco-2 sejtekben bekövetkezett nekrozist.

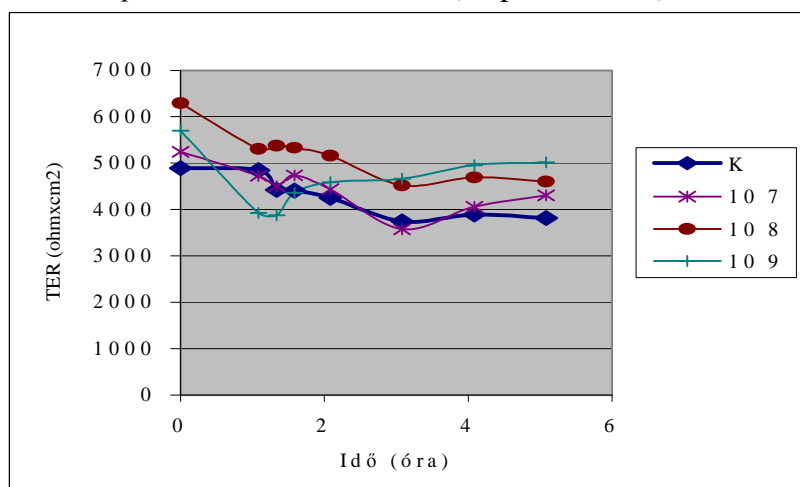


3. ábra: *L. plantarum* 2142, *L. curvatus* 2775 tapadása Caco-2 sejtekhez

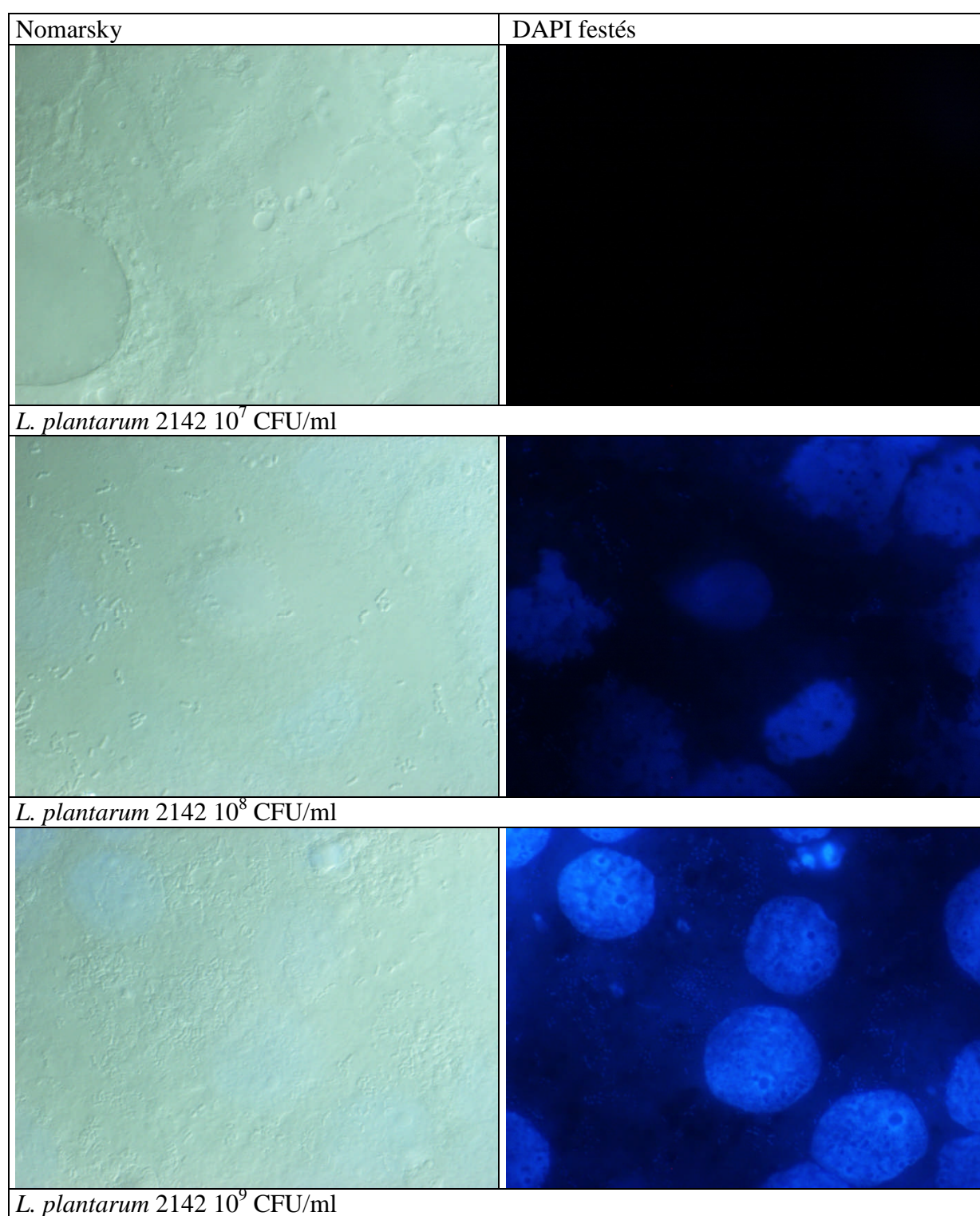
Különböző koncentrációjú *L. plantarum* 2142-vel kezelve a sejteket, a TER nem változott, 10^9 CFU/ml baktérium esetén a mosást követően is visszaállt az eredeti értékhez közel (4.-5. ábra). Ugyanakkor 10^8 és 10^9 CFU/ml baktériummal kezelve a Caco-2 sejteket nekrosis következett be, ami valószínűleg a tejsavbaktérium hatására a sejtenyészetben bekövetkezett savanyodás okozott (6.-7. ábra.)



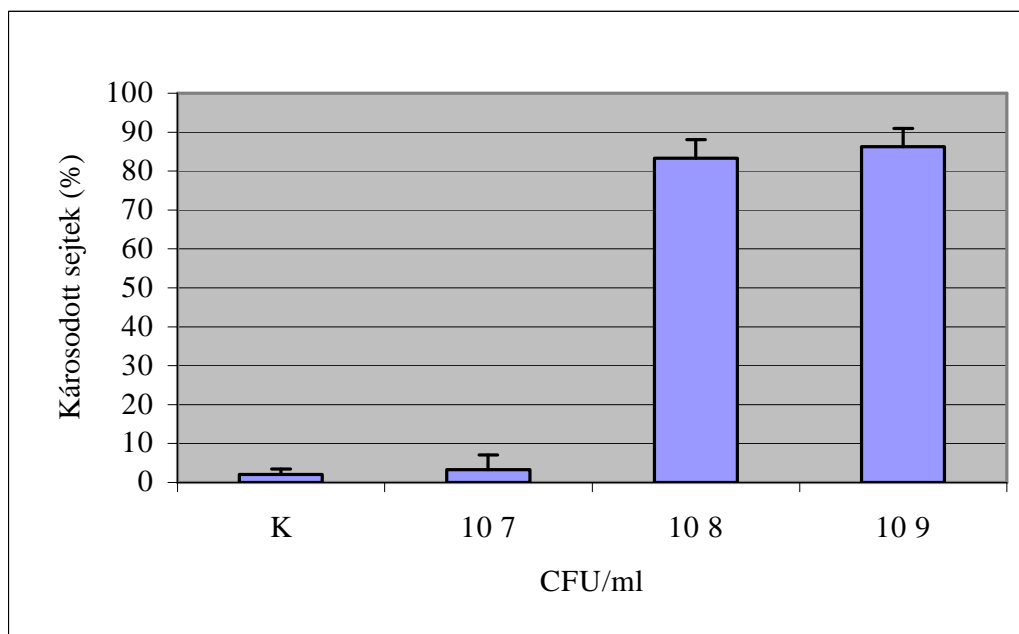
4. ábra: TER változás *L. plantarum* 2142 hatására (60 perc kezelés)



5. ábra: TER változás *L. plantarum* 2142 hatására 60 perc kezelést követően



6. ábra *L. plantarum* 2142 hatása Caco-2 sejtek nekrozisára



7. ábra: *L. plantarum* 2142 hatása Caco-2 sejtek nekrozisára

A szelekciós szempontok szerint választott törzseket a modell-kísérletekre alkalmas sejtszámra felszaporítottuk.

Sejtalkotók izolálása

Szelektált LAB törzsekből és élesztőből feltárt sejt üledéket, illetve fagyasztással, hővel, besugárzással elpusztított holt sejteket, továbbá tisztított DNS-t a kísérletekhez szükséges mennyiségben izoláltuk.

Az előző évi sokoldalú vizsgálatok alapján mind tejsavtermelés, mind pedig mikroba gátló aktivitás alapján a *Lb. plantarum* 2142 törzset (LB) választottuk ki a további állatkísérletekhez. A sejteket MRS-tápközegben szaporítottuk és stationer fázisban lévő sejttömegből készítettük hőkezeléssel a holt sejteket (LBHD), valamint natív sejtekből történő feltárással a sejtfal üledéket (LBSF). Az élesztő minta *Candida glabrata* CBS38 (élelmiszerromlást okozó törzs) TGE-tápközegben elszaporított sejttömege volt (CG). Az élesztő a LB által termelt bakteriocin oldattal szemben érzékeny. A CTAB- módszerrel tisztított DNS-t a kísérletekhez szükséges mennyiségben natív LB sejtekből izoláltunk (LBDNS).

Marker antigén (OVA) felvétel és transzlokáció kinetikája

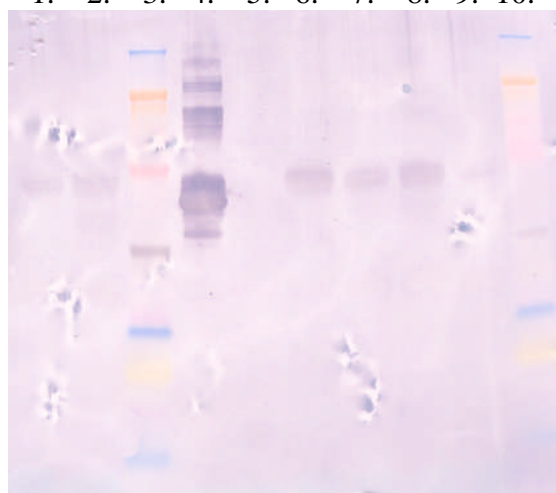
Az adjuván dózisok beállítása céljából előkísérleteket végeztünk.

Növényi lektinek. Az orális adjuvánként használt lektinek közül a tervezettel (Soybean Agglutinin, SBA) szemben egy erősebb mitogén lektint, a *Phaseolus vulgaris* eredetű fitohemagglutint (Phytohemagglutinin, PHA-L) használtuk fel a kísérletekben (Gelencsér et al., 2004). Az adjuvási dózis meghatározására patkány modell helyett egér modellt használtunk a témavezető Rowett Research Institute (UK) szerzett metodikai tapasztalatai alapján. Az immun-modulációs kísérletek egy részét, az MTA és a LTA közötti kétoldali együttműködés keretében (No22 "Immunomodulative properties of food (2002-2004)", illetve

az EU Centre of Excellence (Institute of Animal Reproduction and Food Research the Polish Academy of Sciences, Olsztyn) nyílt lehetőségünk elvégezni, a partnerek szintén az egér modellt részesítették előnyben. Megállapítottuk, hogy az antigén felvétel már 15 perc múlva mérhető és 60 perc múlva éri el a maximális mértéket. Az alkalmazott orális adjuváns (PHA-L) dózisfüggően növelte az antigén felvétel mértékét. Az immun-modulációs vizsgálatokban ezért min. 100µg PHA-L adjuváns adását terveztük.

Mikrobiális adjuvánsok. Az OVA felvétel és transzlokáció kinetikáját a továbbiakban mikrobiális adjuvánsokkal vizsgáltuk (Nagy et al., 2005). OVA-mentes diétán tartott, hím ivarú, 6-8 hetes, Wistar törzsű patkányok (9 állat/csoport) 0.3 mL fiziológias oldatban gyomorszondán át 100mg OVA-t, vagy 100mg OVA és különböző dózisu adjuvánsot (10^8 sejt CG; 10^8 - 10^{10} sejt LB10¹⁰ sejt LBHD, 10^{10} sejt LBDNS, 10^{10} sejt LBSF) kaptak. A kontrol állatok sóoldatos kezelést kaptak. Csoportonként 3-3 állatból az intubációt követő 0, 30, 60 és 120 perc múlva monitoroztuk a vékonybél lumenből fiziológias sóoldattal kimosott, túlélő OVA-t, illetve 1 %-os heparinos vérsérumból vizsgáltuk az OVA felvételt kompetitív indirekt ELISA-val, illetve 4-12 % Bis-Tris SDS PAGE gradiens gélben (NOVEX, NuPAGE) végzett elektroforézist követő, enzimjelzéses jelzéses immunoblott (WesternBreeze, NOVEX) analízissel. Megállapítottuk, hogy az OVA immunreaktív formában megtalálható a patkány vékonybélben (6). Hasonló módon, de kisebb intenzitással kimutatható az orális adjuvánssal adott OVA (1, 2, 7,8) vékonybélben és ez nyomokban még 120 perc múlva is fennmarad (9).

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.



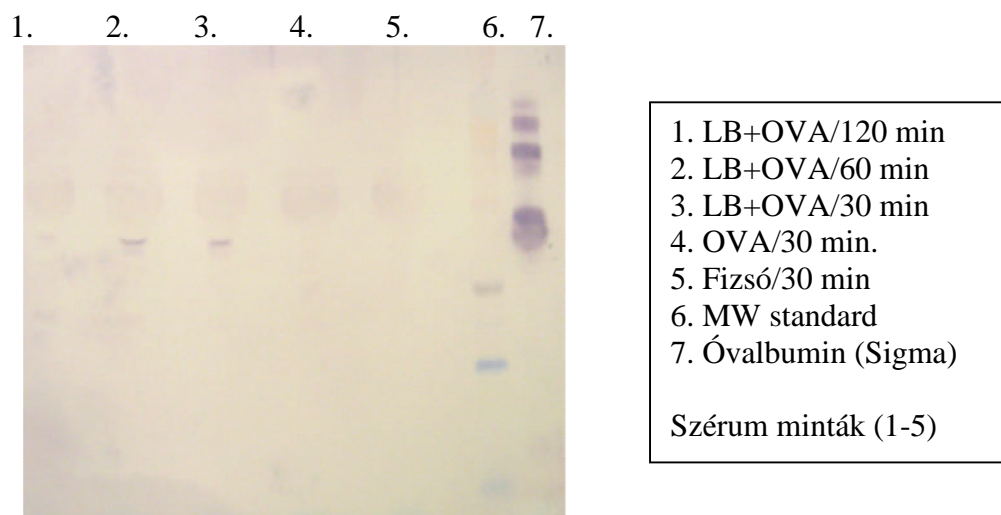
1. LBsejtüledék+OVA/30 min
2. HDLB+OVA/30 min
3. MW standard
4. Óvalbumin (Sigma)
5. Fízsó/30 min
6. OVA/30 min
7. LB+OVA/30 min
8. LB+OVA/60 min
9. LB+OVA/120 min
10. MW standard

Bélmosó minták (1-2, 5-9)

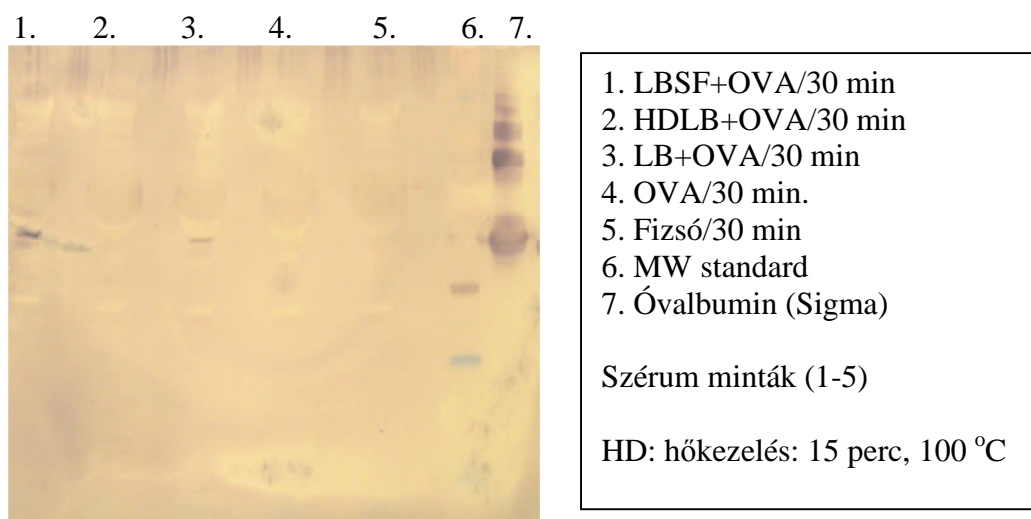
8. ábra: Mikrobiális orális adjuvánsok hatása OVA patkány vékonybélben történő túlélésére. SDS PAGE elválasztást követő immunblottal történő azonosítás anti-OVA nyúl IgG ellenanyag felhasználásával

Az OVA transzlokációt vizsgálva megállapítottuk, hogy az antigén felvétel a patkány szérumban már 30 perc múlva mérhető volt, mely dózisfüggően növekedett. A vizsgálatba vont 5 LAB törzsből a LAB 2770 törzs már 10^8 sejtszám mellett is jelentősen megnövelte a vérsérumban mérhető marker antigén szintjét (80µg/ml OVA) az OVA mentes kontrollal és a vizsgált többi törzsszel szemben (< 10µg/ml OVA).

Míg a LB esetében az OVA felvétel 60 perc múlva érte el a maximumot, addig a sejtfalalkotók esetében a maximális felvétel már 30 perc múlva jelentkezett (9-10. ábrák). Az immun-modulációs vizsgálatokban ezért a magasabb sejtszámú dózisu adjuváns kezeléssel a kísérleteket megismételtük.



9. ábra: Mikrobiális eredetű orális adjuvánsok (LB 10^{10} sejt) hatása az OVA transzlokációjára. SDS PAGE elválasztást követő immunblottal történő azonosítás anti-OVA nyúl IgG ellenanyag felhasználásával



10. ábra: Mikrobiális eredetű orális adjuvánsok (LBSF 10^{10} sejt, HDLB 10^{10} sejt) hatása az OVA transzlokációjára. SDS PAGE elválasztást követő immunblottal történő azonosítás anti-OVA nyúl IgG ellenanyag felhasználásával

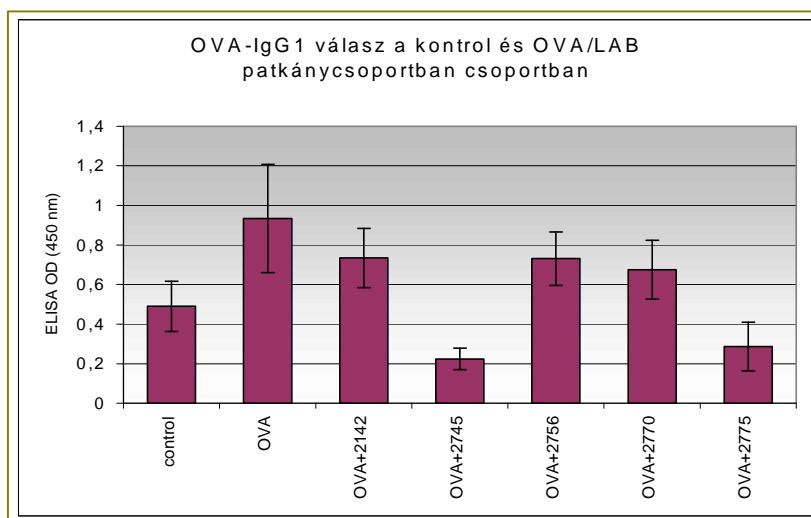
In vivo patkánymodell

Orális tolerancia kiváltása. Patkány modellben tanulmányoztuk a T-sejt függő marker antigénre (OVA) adott tolerancia válasz minőségét orális adjuvánsok (PHA, szelektált LAB törzsek és sejtalkotók) adása mellett és nélküle.

PHA orális adjuvánsként történő felhasználásakor OVA mentes diétán tartott BALB/c egereket érzékenyítettünk, míg a kontrol állatokat fizioológias sóoldattal kezeltük. Az érzékenyítést követő 7. és 14. napon az állatokat CFA adjuváns és OVA vakciantigén *subcutan* adásával immunizálva vizsgáltuk (ELISA) a tolerancia kialakulását vagy áttörését a keringő specifikus ellenanyagok (IgG) szintjének monitorozásával (Gelencsér et al., 2004). Megállapítható volt hogy a vakcina antigénnel történt immunizálást követő napokon mért

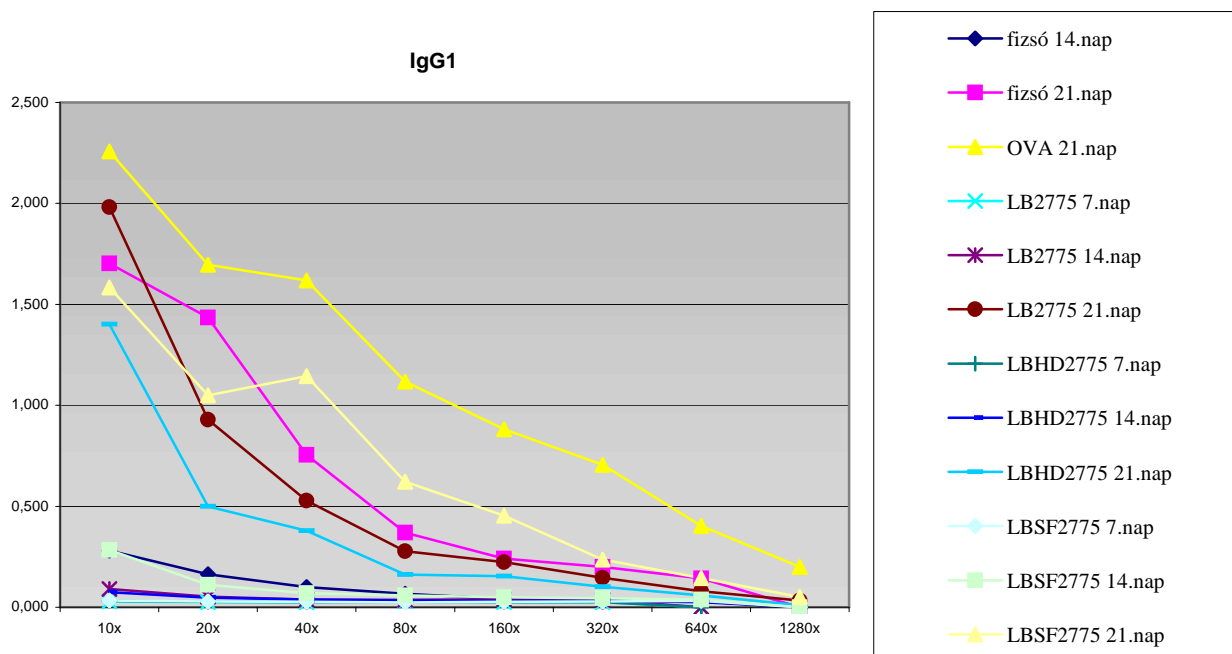
OVA-IgG szintje jelentősen lecsökkent, amikor az érzékenyítést adjuváns adása mellett végeztük az OVA csoporttal mérhető szinttel szemben, míg a kontrol csoportban jelentős OVA-IgG szintnövekedést tapasztaltunk. A PHA adjuváns adása így jelentősen megnövelte a tolerancia válasz kialakulását BALB/c egerekben, míg a kontrol csoportban az ismételt immunizálás erős OVA-specifikus vakcina antigénre adott immunválaszt indukált.

A jó fermentációs és mikroba gátló tulajdonsággal rendelkező szelektált LB törzsek (2142, 2745, 2756, 2770, 2775) felhasználásával végzett kísérleteinkben vizsgáltuk (Baráth et al., 2004; Nagy et al., 2005), hogy a probiotikus LAB törzsek képesek-e az orálisan stimulált T-sejtek vakcina antigénre (OVA) adott válaszát tolerancia irányába visszafordítani. Az orális tolerancia kiváltására OVA-mentes diétát fogyasztó hím ivarú, Wistar törzsű, 4-6 hetes patkányokat (5 állat/csoport) LB adása (százmillió sejt 0,3 mL fizioológias sóoldat) mellett vagy nélküle 10 mg OVA-val orálisan érzékenyítettük, míg a kontroll állatokat fizioológias sóoldattal kezeltük. Az érzékenyítést követő 7. és 14. napon az állatokat *subcutan* immunizáltuk 50 μ g CFA adjuváns 500 μ g OVA együttes adásával. Egy héttel később a tolerancia kialakulását vagy áttörését vizsgáltuk (ELISA) a keringő specifikus ellenanyagok (OVA-IgG, OVA-IgG₁) szintjének monitorozásával. Az eredményeket ANOVA multivariancia analízissel értékeltük. Megállapítottuk, hogy a kontrol állatok (K) vakcina antigénre adott OVA-IgG válasza a második immunizálást követően kismértékben nőtt, míg az OVA és LB törzsekkel érzékenyített csoportok esetében ez a növekedés jelentős volt. A kontrol, nem stimulált állatok (K) esetében a második immunizálást követően kismértékű növekedést tapasztaltunk az OVA-IgG₁ válaszbán, míg az OVA-val érzékenyített állatokban a vakcina antigénnel szembeni OVA-IgG₁ a második immunizálást követően szignifikánsan megnőtt. A LB törzsekkel érzékenyített csoportokban a vakcina antigénnel szembeni OVA-IgG₁ mértéke csökken, amit a tolerancia visszaállításának és a TH₂ út elnyomásának tulajdonítottunk). A legkedvezőbb eredmények a LB 2745 és LB 2775 törzsek esetében mutatkoztak (11. ábra).



11. ábra: Orális tolerancia kiváltása. OVA-mentes diétát fogyasztó választási patkányokat adjuváns (LB) adása mellett vagy nélküle OVA-val orálisan érzékenyítettük, míg a kontroll állatokat fizioológias sóoldattal kezeltük. Az érzékenyítést követő 7. és 14. napon az állatokat CFA adjuváns mellett OVA vakcina antigénnel immunizáltuk. Egy héttel később a tolerancia kialakulását vagy áttörését vizsgáltuk (ELISA titergörbe maximális lekötésének 75%-nál mért abszorbancia értékek) a keringő specifikus ellenanyagok (IgG₁) szintjének monitorozásával.

A legkedvezőbb eredményt adó LB 2775 törzsből hőkezeléssel holt sejteket (LBHD 2775), illetve valamint a natív sejtekkel történő feltárással sejtfal üledéket (LBSF 2775) preparáltunk. Kísérleteink a fentiekhez hasonló trendeket mutattak. A LBHD-val érzékenyített csoportokban a vakcina antigénnel szembeni OVA-IgG₁ mértéke csökkent a legnagyobb mértékben, amit a tolerancia visszaállításának és a TH₂ út elnyomásának tulajdonítottunk, míg a SF-csoport gyengébb eredményeket adott, mint a natív LB(12. ábra).



12. ábra: Orális tolerancia kiváltása. OVA-mentes diétát fogyasztó választási patkányokat adjuváns (LB sejtalkotók) adása mellett vagy nélküle OVA-val orálisan érzékenyítettük, míg a kontroll állatokat fiziológiás sóoldattal kezeltük. Az érzékenyítést követő 7. és 14. napon az állatokat CFA adjuváns mellett OVA vakcina antigénnel immunizáltuk. Egy héttel később a tolerancia kialakulását vagy áttörését vizsgáltuk (ELISA titergörbe) a keringő specifikus ellenanyagok (IgG₁) szintjének monitorozásával.

Orális érzékenyítést követő immunválasz kiváltása. OVA-mentes diétát fogyasztó kifejlett immunrendszerű, hím BALB/c egereket (16 állat/csoport) 100µg adjuváns (PHA) adása mellett vagy nélküle, három alkalommal (1,2,7 napon) 1 mg OVA-val orálisan érzékenyítettük, míg kontrollcsoport állatait fiziológiás sóoldattal kezeljük. A kísérletet a 21. napon zártuk. Minden kísérleti csoportból 4-4 állatot szelektáltunk (0 kontrol), a 3., 8., 14., és a 21. napon (teszt csoportok) megöltük. A kísérletből nyert biológiai mintákból (vér és béltartalom) monitoroztuk (ELISA) a specifikus lokális (IgA) és humorális (IgG /esetleg IgG alosztályok) ellenanyagválaszt. A sejtes immunválaszt az immunszervekből (lép, bélfodri nyirokcsomó) izolált mononukleáris sejtek spontán és mitogén stimulusra adott ellenanyag válaszával jellemeztük (ELISA, ELISPOT). A PHA adjuvánssal együtt adott OVA csoportok esetében a tápcsatornában mérhető OVA-IgG szintjében jelentős elváltozást nem tapasztaltunk. Asejtes válasz minőségében nem tapasztaltunk lényeges eltérést a kontrol és adjuvánssal együtt adott OVA tesztcsoport esetében. Az eredmények alapján megállapítható, hogy PHA adjuváns adása esetében az antigén-specifikus válaszban erősödött az antigén kizárással együttjáró, lokális immunvédelem.

LTA-MTA együttműködésben végzett kutatásokban, orális érzékenyítést követő immunválasz kiváltásához az OVA-mentes diétát fogyasztó hím ivarú, 8 hetes, BALB/c egereket (10 állat/csoport) használtunk LB törzsek (*Lb. salivarius* AWH, LS; *Lb. casei* LcY, LC; *Lb. plantarum* 2142, LB) orális adjuvánsként történő felhasználásával (Nagy et al., 2002; Nagy et al., 2005). Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt négy alkalommal LB adása (százmillió sejt 100 µl fiziológiás sóoldat) mellett vagy nélküle kezeltük. A kísérlet induló napján az állatokat 25 mg OVA-val vagy 25 mg OVA és LB (százmillió sejt 100 µl fiziológiás sóoldat) együttes adásával orálisan érzékenyítettük, míg kontrollcsoport állatait fiziológiás sóoldattal kezeltük. A kísérlet 7 és 14. napján az állatokat *subcutan* immunizáltuk (100 µl FCA+ 100 µg OVA). A kísérletből nyert (22 nap) biológiai mintákból (vér és béltartalom) monitoroztuk (ELISA) a specifikus lokális (OVA-IgA) és humorális (OVA-IgG, OVA-IgA) ellenanyagválaszt. A sejtes immunválaszt a lépéből izolált mononukleáris sejtek spontán és mitogén stimulusra adott ellenanyag (OVA-IgG, OVA-IgA) válaszával jellemeztük (ELISA, ELISPOT). Megállapítottuk, hogy az OVA-val érzékenyített állatok, melyeket a kísérlet előtt LB törzsszel kezeltünk jobban válaszoltak a vakcia antigénre, mint amelyek nem kaptak előkezelést. Az vakcina antigénre kiváltható, antigén kizárást segítő lokális IgA válaszok szintje azokban az állatokban megemelkedett, ahol az állatokat mind a kísérlet előtt, mind pedig az OVA érzékenyítésnél is előkezeltük LB törzsszel.

A kutatás eredményeképpen a tápcsatorna immunitás vizsgálatára alkalmas patkány-modell kifejlesztése valósult meg. Megállapítást nyert, hogy a növényi és mikrobiológiai eredetű sejtalkotók orális adjuvánsként történő alkalmazásával a tápcsatorna immunitás modulálására nyílik lehetőség. A kísérleti eredmények alapján összeállított publikáció/k referált folyóiratban történő közlése részben megtörtént, illetve folyamatban van.

A téma kidolgozásában három, nemzetközileg elismert és megfelelő módszertani jártassággal rendelkező kutató, valamint három PhD hallgató vett részt. A KÉKI biztosította a törzsszelekciós, szaporítási, izolálási, sejtes, immunanalitikai és DNS munkákhoz szükséges laboratóriumi eszközöket és berendezéseket (pl. hűthető centrifuga, rázó-termosztát, UV/VIS fotométer, automatikus mikrotiter rendszerű ELISA mérőrendszer, széndioxid termosztát, laminar flow, stb.).

Referenciák:

- Baráth, Á., Corsetti, A., Halász, A., & Gelencsér, É. (1999) New aspects for selection criteria of lactic acid starter cultures. In: R. Lasztity et al. (eds.) *Functional Foods – A new challenge for food chemists. Proceedings of EURO FOOD CHEM X. 22-24 September, 1999, Budapest, Hungary.* FECS-Event No 234. 37-35.
- Baráth, Á., Halász, A., Gelencsér, É. (2004): *Some properties of selected LAB strains.*, 9th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of FOOD Allergy (ed.: Anklam, E. & Morlin F) Budapest, No:78, pp. 159.
- Gelencsér, E., Grant, G. & Kelly, D. (2004): In: Muzquiz M, Hill GD, Cuadrado C, Pedrosa MM, Burbano C (ed.) *Assessment of the potential of legume lectins to act as a mucosal adjuvant. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds.* EAAP publication No. 110, Toledo, Spain, 8-10 March 2004, Proceedings of fourth international workshop on antinutritional factors in legume and oilseeds, Wageningen: Academic Publisher, 2004. pp.137-143. ISBN 9076998396, ISSN 0071-2477.

- Halász A: *Positive microbial processes: selection aspects for starter cultures*, CEFOOD 1., Ljubljana, 2002: GL 02-01, 2002.
- Halász, A., Baráth, Á., Németh, E. & Zalán, Zs. (2004) Selection of LAB stains for breadmaking. *Proceedings of International Congress FLOUR-BREAD' 03 4th Croatian Congress of Cereal Technologists May, 2004, Osijek, Croatia*. ICC-IA CST, UDC 664.642:279.67 pp. 238-243.
- P. Brandtzaeg (2001): Nature and function of gastrointestinal antigen-presenting cells. *Allergy. Eur. J. Allergy and Clinical Imm.*, Vol. 56., No. 67., 16-21.
- L. Capurso (2001): Probiotics and prebiotics and food intolerance. *Allergy. Eur. J. Allergy and Clinical Imm.*, Vol. 56., No. 67., 125-126.
- P. Garside, A. Khoruts, A. McI Mowat (1999): Review. Oral tolerance in disease. *Gut*, 44, 134-142.
- É. Gelencsér, A. Pusztai, G. Grant & S. Bardocz (2000). Novel dietary strategy to stimulate immune exclusion potency of the rat gut and reduce antinutrient effects of soya whey. (2000). *COST 98: Effects of Antinutrients on the Nutritional Value of Legume Diets*, Vol. 9, Abstr., pp. 148-149. Eds.: S. G. Pierzynowski, J. M. Gee & J. Svendsen; Tech. Ed.: E. Salek. Office for Publications of the European Communities, Luxembourg.
- G. Garcia & H.L. Weiner (1999): Manipulation of Th responses by oral tolerance. Current topics in Microbiol. And Immunol., Vol. 238., 123-145.
- M. Kjerrulf, D. Grid, M. Kopf & N. Lycke (1998): Induction of gut mucosal immune responses of genetic background and Th1/Th2 cross regulation. *Scan. J. Immunol.* 47, 401-407.
- P.V. Kirjavainen (2005): 5. Prebiotics and management of food allergy. In: *Functional dairy products*. Ed.: T. Mattila-Sandholm & M. Saarela. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, Cambridge, England, Part I., The health benefits of functional dairy products., pp.108-132.
- T. Matsuzaki & J. Chin (2001): Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Imm. and Cell Biology*, 78 (19), 67-73.
- L. Mayer, K. Sperber, L. Chan, J. Child & L. Toy (2001): Oral tolerance to protein antigens. *Allergy. Eur. J. Allergy and Clinical Imm.*, Vol. 56., No. 67., 12-15.
- Németh, E., Koninkx, J. & Malago, J. (2003): Microbial products of Lactobacilli inhibit Salmonella induced Interleukin-8-synthesis, Lippay-Ormos-Vas Scientific Conference, Budapest, pp. 197.
- Németh, E., Koninkx, J. & Malago, J. (2004a): *Investigation of the immune stimulative effect of lactobacilli and their spent culture supernatant*. 2nd CEFOOD Congress on Food, Safety, Nutrition, Technology, Consumer, Budapest. P-S-55, pp. 223.
- Németh, E., Koninkx, J. & Malago, J. (2004b): *Investigation of role of lactobacilli in the strengthening of gut barrier function*. 9th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of FOOD ALLERGY(ed.: Anklam E, Morlin F), Budapest, No 46, pp.143.
- Németh, E., Adányi, N., Halász A., Váradi, M. & Szendrő, I.: Real time study of the effect of different electrochemical factors on lactic acid bacteria by using electrochemical optical waveguide lightmode spectroscopy (EC-OWLS). *Journal of Microbiological Methods* (submitted for publication).

- Nagy, A., Jedrychowski, L., Gelencsér, É., Wróblewska, B., Szymkiewicz, A. (2002): Immunomodulative effect of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus Casei* strains. *Pol. J. Food and Nutr. Sci.* Vol. 11/52., No. 2.: pp. 122-124.
- Nagy, A., Jedrychowski, L., Gelencsér, É., Wróblewska, B., Szymkiewicz, A. (2005): Induction of specific mucosal immune responses by viable or heat denatured probiotic bacteria of *Lactobacillus* strains. *Acta Alimentaria*, Vol. 34 (1), pp. 33-39
- Nagy, A., Baráth, Á., Halász, A., Gelencsér, É. (2005): Modulating of the immune responses to a co-administered marker antigen by selected *Lactobacillus* strains used as oral adjuvant. InformAll Plenary Meeting 6th, Communicating about Food Allergies- Information for Consumers, Regulators and Industry, Athens, Greece, 24-26th October 2005
- S. Strobel c A. McI. Mowat (1998): Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Imm. Today*. Vol. 19. No.4. 173-181.
- R. Rappuoli, M. Pizza, G. Douce & G. Dougan (1999) Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Imm. Today*. Vol. 20., No.11. 493-500.
- M. E. Sanders (1993): Lactic cultures and human health. In.: *Advances in Food and Nutrition Research*. Ed.: J. E. Kinsella. Acad. Press. Inc. San Diego, Vol. 37. 67-130.